

D-システイン投与によるメチル水銀の体内蓄積抑制作用

谷 由美子・井関 雅美*・岩田 紘実**

Suppressive Effect of Dietary D-cysteine on Accumulation of Methylmercury in Tissues of Rats.

Yumiko TANI, Masami ISEKI and Hiromi IWATA

緒 言

平成15年6月に、厚生労働省から「水銀を含有する魚介類等の摂食に関する注意事項」が発表された。これは食物連鎖により一部の魚介類に水銀が蓄積し、人の健康特に胎児に影響を及ぼすレベルの濃度に達しているため、妊娠中か妊娠の可能性のある女性に対して、キンメダイとメカジキについては摂食頻度を週2回以下にするよう注意を喚起したものである。自然界に存在する無機水銀も、微生物によって有毒なメチル水銀に変化し、食物連鎖によってカジキなど大型魚やキンメダイなど深海魚およびクジラ類に蓄積することが知られている。無機水銀の吸収率はわずか5%以下であるが、メチル水銀など有機水銀の吸収率は90%以上と高く、中性アミノ酸運搬システムで脳へ取り込まれ¹⁾²⁾神経毒(知覚異常、運動失調、感覚・言語障害、視野狭窄など)³⁾⁴⁾を示す。

メチル水銀による健康への影響としては、水俣病がもっとも広く知られている。水俣病は、わが国の公害の原点とも言うべき出来事で、大きな被害と教訓をもたらした。主に神経系に生じる障害は重篤であり、日本だけでなく世界にその恐ろしさを知らしめた。また最近では、米国においてワクチンに添加されている微量の防腐剤チオメロサル(水銀化合物)が自閉症などさまざまな疾患の原因になっている疑いがもたれた。しかし水銀化合物の血中半減期が6~7日と短いため、ワクチンの次回接種までに水銀は全て排泄されており安全であると発表され⁵⁾大きな問題には発展しなかった。

厚生労働省の調査研究によると平成7~11年の我が国における通常の食事の平均水銀摂取量は $9.0\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ となっており、その大部分は魚介類由来と考えられている。この値は水銀の暫定的摂取量である $35.5\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ の約3割であり、直ちに影響が現れる心配はない。しかし魚介類の摂取量が多い日本人にとって、上述の厚生労働省の勧告は深刻な問題である。また魚は栄養学的に利点が多く、積極的に摂取するに値する食品であるため、水銀の有害性を減少させる対策は重要である。

メチル水銀については、フィチン酸による吸収阻害やセレンおよびメタロチオネインとの結

* 福井県職員 ** 社会福祉法人聖隷福祉事業団

合によって毒性発現が抑制されることが知られている。またBallatoriら⁶⁾は広く利用されている無毒なアミノ酸誘導体で、排泄速度の速いN-アセチルシステインを投与して、腎、肝、脳組織の水銀量の減少および尿中水銀量の増加を認めている。チオール基をもつ化合物は、メチル水銀と高い親和性をもつことが知られているが、L-システインは脳へのメチル水銀の運搬を増加促進する報告がある¹⁾⁷⁾。そこで著者らは、吸収後利用されずに短時間で体外へ排泄される⁸⁾D-システインをメチル水銀投与ラットに与え、水銀の体内蓄積抑制作用について検討した。

実験方法

1. 実験動物および飼育方法

5週齢(体重130g前後)のWistar系雄ラット(静岡県浜松市、日本エスエルシー株式会社より購入)18匹を用いて、水銀食 普通食群、水銀食 D-システイン食群、混合食 普通食群に分け、各群6匹として4週間飼育した。いずれの群も購入後3日間、日本クレア株式会社製飼料(CE-2)を与えて予備飼育した。その後、水銀食 普通食群は水銀添加食で2週間飼育後普通食(CE-2)で2週間飼育、水銀食 D-システイン食群は水銀添加食で2週間飼育後D-システイン食で2週間飼育、混合食 普通食群はD-システイン混合水銀添加食で2週間飼育後普通食で2週間飼育した。水銀添加食は、Adachiらの報告⁹⁾に準じて、塩化メチル水銀20 $\mu\text{mol/kg}$ に相当する量を14日間で与えた。即ちCE-2に5 mg/dl塩化メチル水銀エタノール溶液(塩化メチル水銀は東京化成工業株式会社製の純度75%ものを使用)を毎日2.4ml混合して与えた。5 mg/dl塩化メチル水銀エタノール溶液は、冷蔵保存下で調整後1週間は安定であることを予備実験により確認したため4日分をまとめて調整した。水銀添加食では、完食する量を与え、ラットの水銀摂取量を一定にした。結果的に14日間でメチル水銀(純度75%)26 $\mu\text{mol/kg}$ 摂取したこととなった。D-システイン食は、D-システイン塩酸塩水和物(和光純薬製)をCE-2に0.3%添加した。これはAdachiらの報告⁹⁾の10倍量に相当する。このD-システイン食は1週間分調整し、密封容器にて冷蔵保存した。D-システイン混合水銀添加食は、上記のD-システイン食に水銀添加食調整時の要領で5 mg/dl塩化メチル水銀エタノール溶液を添加した。水は各群とも水道水を自由摂取で与えた。

飼育は個別ケージを使用し、室温 20 ± 1 ℃、相対湿度 60 ± 5 ％、1日12時間採光下(7:00 a.m. ~ 7:00 p.m. 明期)の空調付き動物室内で行った。飼育期間中は週に1回体重を測定し、飼料摂取量は残量を投与量より差し引いて算出した。また、飼育終了前3日間は代謝ケージ内で飼育し、糞・尿を採取し水銀量の測定に用いた。飼育終了後に一晩絶食させ、エーテル麻酔下で解剖し採血してから肝臓、腎臓を摘出して重量を測定した後、体毛を採取した。血清は常法通り分離した。

動物実験は「名古屋女子大学動物実験指針」ならびに「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和55年3月総理府告示6号)に準じて実施した。

2. 総水銀の定量

食品衛生試験法注釈¹⁰⁾および田村ら¹¹⁾の方法に準じて還元気化原子吸光光度法で測定した。

1) 検体中のメチル水銀の分解

ホモジナイズした試料(体毛、肝臓、腎臓、糞)、尿および血清の適量をそれぞれ三角フラスコにとった。ガラスビーズを2個、エタノール0.3mlを加え、さらに硝酸8mlを入れ振り混ぜた。2~3分静置すると激しい反応が起こり褐色ガスが発生した。その後沸騰水浴中に入れ、

褐色ガスの発生がなくなるまで40分ほど加熱した。次いで氷水中で冷却後、再びエタノール0.3 mlを加え十分に反応した後、硫酸 5 mlを少量ずつ注意しながら加えた。次いで沸騰水浴中で褐色ガスの発生がなくなるまで40分ほど加熱分解した。さらに10%尿素液 3 mlを加えて 5 分間沸騰水浴中で加熱を続けた。冷却後、蒸留水を加えて全量50mlにした。この分解溶液の一部を計り取り、還元気化原子吸光分析に供した。同時に空試験を行った。なおこの分解操作は、多量の酸化窒素ガスが発生するためドラフト内で行った。

2) 検体中総水銀量の測定

0.02 ~ 0.3 μg の水銀含有分解溶液および空試験溶液を50ml遠沈管へ精秤した。次いで 5 N硫酸で全量を20mlとした。その後、50ml遠沈管にシリコンゴムのついたガラス製の栓をし、金具で固定した。ここに 1 %塩化第一スズ溶液 2 mlをシリンジを用いてシリコンゴムを通して注入し、380rpm/分の速度で 4 分間振とう器にかけた。シリンジを用いて50ml遠沈管中の水銀蒸気を正確に 5 mlとり(図 1)、直接原子吸光分析装置の注入口へ注入し、ただちにポンプを作動させ253.7nmの波長の吸収を測定した(図 2)。吸収液は、0.3%過マンガン酸カリウム溶液と希硫酸(1 : 15)を 1 : 1に混合したものを使用した。



図 1 水銀蒸気の採取法

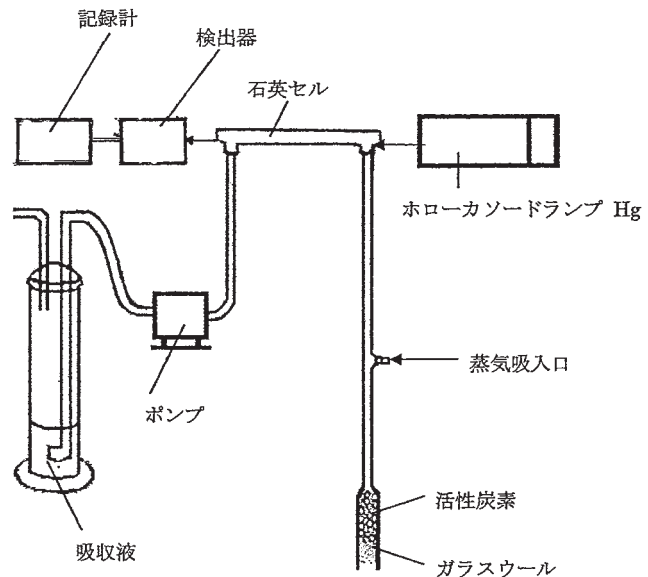


図 2 水銀の測定法

3) 検量線の作成

検体中メチル水銀の分解、検体中総水銀量の測定と同様に標準液を用いて行い、検量線を作成した。50ml三角フラスコに0.05mg/dl塩化メチル水銀標準液をマイクロピペットで0.125ml, 0.250ml, 0.375ml, 0.500ml, 0.625ml, 0.750ml(各々メチル水銀0.0625 μg , 0.125 μg , 0.1875 μg , 0.25 μg , 0.3125 μg , 0.375 μg 含有)とり、上記の方法で分解し、分解液を20mlにとって総水銀量を測定し検量線を作成した。

3. 統計処理

データは平均値 \pm 標準誤差で示し、統計ソフト(SPSS ver11.0J WindowsXP)を使用して、ANOVAによる検定後、TurkeyのHSDテストによって群間の有意差($p < 0.05$)を判定した。

結 果

1. 体重増加率, 平均飼料摂取量, 臓器体重比率, 3日間尿量

体重増加率, 臓器体重比率, 3日間尿量を表1に示した. 平均飼料摂取量は $22 \sim 23\text{g} / \text{匹} / \text{日}$ で3群間に差がなかった. 体重増加率, 腎臓体重比率, 3日間尿量は群間に差はなかった. 3日間糞量は水銀食 普通食群が $26.9 \pm 1.1\text{g}$, 水銀食 D-システイン食群は $28.9 \pm 1.0\text{g}$ となり, 群間に差はなかった. 肝臓体重比率は水銀食 普通食群に対して水銀食 D-システイン食群で有意に低下し, 混合食 普通食群で低下傾向がみられた.

表1 メチル水銀投与ラットの体重増加率、肝臓・腎臓の体重比率、尿量におよぼすD-システインの影響

区 分	体重増加率 (%)	肝臓 体重比率 (%)	腎臓 体重比率 (%)	3日間尿量 (ml)
水銀食－普通食群	196 ± 2^a	4.0 ± 0.3^a	0.79 ± 0.02^a	89.1 ± 12.1^a
水銀食－D-システイン食群	196 ± 6^a	3.3 ± 0.0^b	0.82 ± 0.03^a	75.0 ± 2.5^a
混合食－普通食群	196 ± 2^a	3.4 ± 0.1^{ab}	0.81 ± 0.02^a	69.7 ± 3.2^a

数値は $M \pm SE$ を示す。

異なるアルファベット間に $p < 0.05$ で有意差があることを示す。

実験期間中の塩化メチル水銀摂取量 (純度100%として) は, 各々 $1.2 \pm 0\text{mg}$, $1.2 \pm 0.1\text{mg}$, $1.3 \pm 0\text{mg}$ となり, 3群間に差はなかった. D-システイン摂取量は水銀食 D-システイン食群 ($1.0 \pm 0\text{g}$) に対して, 混合食 普通食群 ($0.9 \pm 0\text{g}$) で有意に少なかった.

2. 血清・臓器・体毛・尿・糞中総水銀量

血清・臓器・体毛・尿・糞中総水銀量の実験結果を表2に示した.

血清中総水銀量は水銀食 普通食群に対して水銀食 D-システイン食群では有意に減少し, 混合食 普通食群では有意に増加した.

肝臓中総水銀量は水銀食 普通食群に対して水銀食 D-システイン食群では減少傾向を示し, 混合食 普通食群では有意に増加した.

腎臓中総水銀量は水銀食 普通食群に対して水銀食 D-システイン食群で減少傾向を示した. 混合食 普通食群は水銀食 普通食群とほぼ同じ値を示し, 水銀食 D-システイン食群に対しては有意に増加した.

表2 メチル水銀投与ラットの血清、臓器、体毛中水銀量および尿・糞中排泄量におよぼすD-システインの影響

区 分	血清中水銀量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	肝臓中水銀量 (μg)	腎臓中水銀量 (μg)	体毛中水銀量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	尿中水銀量 ($\mu\text{g}/3\text{days}$)	糞中水銀量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)
水銀食－普通食群	0.066 ± 0.004^a	21 ± 1^a	104 ± 3^{ab}	43 ± 2^a	16 ± 1^a	1.28 ± 0.10^a
水銀食－D-システイン食群	0.035 ± 0.006^b	16 ± 1^a	81 ± 10^a	61 ± 2^b	23 ± 1^b	1.98 ± 0.11^b
混合食－普通食群	0.099 ± 0.006^c	36 ± 4^b	106 ± 5^b	88 ± 4^c	24 ± 1^b	1.93 ± 0.02^b

数値は $M \pm SE$ を示す。

異なるアルファベット間に $p < 0.05$ で有意差があることを示す。

体毛中総水銀量は水銀食 普通食群、水銀食 D-システイン食群、混合食 普通食群の順で有意に増加した。

尿中、糞中総水銀量は水銀食 普通食群に対して、水銀食 D-システイン食群、混合食 普通食群で共に有意に増加した。水銀食 普通食群と水銀食 D-システイン食群の3日間の糞量に差がないことから、混合食 普通食群の3日間の糞量は測定しなかったが、同じレベルと考えられる。従って3日間の糞中総水銀量は、水銀食 普通食群 $33 \pm 2 \mu\text{g}$ に対して水銀食 D-システイン食群 $57 \pm 3 \mu\text{g}$ で有意に増加し、混合食 普通食群も水銀食 D-システイン食群と同等の排泄量と推察される。

考 察

メチル水銀はグルタチオンなどチオール化合物と高い親和性をもつことが知られており、L-システインによって脳へのメチル水銀の運搬を増強することが報告されている¹⁾⁷⁾。Krijgsheldら⁸⁾は、消化管からの吸収はL-システイン、D-システインとも同様に直ちに行われるが、血清システインレベルは各々 $200 \mu\text{M}$ と $1500 \mu\text{M}$ とD-システインが高く、尿中への硫酸排泄量がそれぞれ投与量の33%、55%とD-システインはL-システインに比べて体内の利用がなく、短時間で尿中に排泄されることを報告している。そこで著者らは、たん白質代謝にほとんど影響しなくてチオール基をもつD-システインによるメチル水銀の蓄積抑制効果について実験を行った。

D-システイン摂取量は水銀食 D-システイン食群 ($1.0 \pm 0 \text{ g}$) に対して、混合食 普通食群 ($0.9 \pm 0 \text{ g}$) で有意に少なかった。飼料へのD-システインの添加割合は同じであるため、これはD-システイン摂取の時期が水銀食 D-システイン食群は飼育期間の後半2週間であったのに対して、混合食 普通食群では前半2週間であったことから、ラットの週齢による飼料摂取量の違いのために生じたと考えられる。

体重増加率、腎臓体重比率、3日間尿量では、3群間に差はなかった。肝臓体重比率は水銀食 普通食群に対して水銀食 D-システイン食群で有意に低下し、混合食 普通食群で低下傾向がみられた。水銀を添加しない飼料を与え、同様の条件で飼育したWistar系雄ラットの肝臓体重比率は水銀食 D-システイン食群および混合食 普通食群との差がなかった(データは示していない)。従って水銀食 普通食群の肝臓は、水銀解毒のために肥大したと推察される。

体内のメチル水銀の濃度分布は、吸収初期に血液・肝臓に多く次第に脳に移行し、最終的に肝臓、脳、腎臓、血液に落ちつく¹²⁾。本実験では肝臓、腎臓、血清において、水銀食 普通食群に対し水銀食 D-システイン食群で総水銀量が有意に減少、または減少傾向を示した。一方、水銀食 普通食群に対し水銀食 D-システイン食群で水銀の排泄経路である体毛中、3日間尿中、糞中総水銀排泄量が増加した。このことから、水銀食 D-システイン食群での肝臓、腎臓、血清における総水銀量の減少は、D-システインがすでに体内に存在するメチル水銀と結合し、そのまま体毛への移行および体外へ排泄されたためと考えられる。Ballatoriら⁶⁾は、メチル水銀を腹腔内へ注入して48時間後に鎮咳去痰薬として一般によく使われているN-アセチルシステインを飲水中へ入れて投与した。その結果、著者らと同様に腎、肝中水銀量の減少と尿中水銀量の増加を認めている。彼らの実験ではN-アセチルシステインの添加により脳のメチル水銀蓄積量が減少していた。N-アセチルシステインと同様にD-システインも腸管からの吸収後、体内で利用されないまま排泄されるという代謝経路を示す。従って、本実験では脳中水銀量は測定していないが、D-システインによるメチル水銀の脳への蓄積抑制が推察される。

水銀食 普通食群に対し混合食 普通食群では体毛中および3日間尿中、糞中総水銀排泄量が増加しているにもかかわらず、肝臓、血清中総水銀量が有意に増加した。この事については解剖前3日間の糞中総水銀量は、水銀食 D-システイン食群と混合食 普通食群で差はなかった。メチル水銀は主に胆汁を通して糞中へ排泄されるといわれているので¹³⁾、解剖前の糞中水銀量の大部分は肝臓で生成された胆汁が肝臓中の水銀と共に糞中へ移行したと考えられ、この量は2群間に差はなかった。しかし混合食 普通食群はメチル水銀とD-システインを同時に摂取しているため、システインが持つチオール基とメチル水銀が結合してメチル水銀の吸収率の上昇が推察され、メチル水銀投与時の糞中総水銀量は水銀食 D-システイン食群より低下していたことも推察される。従って飼育全期間中の糞中総水銀排泄量を測定すれば、D-システインによる吸収促進作用がさらに明らかになったものと考えられる。

今回の実験で3群を比較して最も体内水銀蓄積量が少なかったのは水銀食 D-システイン食群であった。このことから、本実験条件下においては、D-システインの水銀蓄積抑制は、水銀と同時に摂取より水銀摂取後遅れて摂取した方が効果が大きいことが示唆された。しかし本実験では、脳中水銀量の測定ができなかったため、この点は明らかにしなければならない。

要 約

5週齢のWister系雄ラットを用いて、水銀食 普通食群、水銀食 D-システイン食群、混合食 普通食群に分け各群6匹として4週間飼育した。そして肝臓、腎臓、体毛、血清、尿、糞中の総水銀量を測定した。総水銀量は、検体を硫酸・硝酸分解後、分解液中の水銀を還元気化させ、冷原子吸光光度法により測定した。

実験結果は以下の通りである。

1. 肝臓体重比率は水銀食-D-システイン食群、混合食 普通食群で低下し、水銀解毒による肝臓肥大がD-システインによって軽減された。
2. D-システイン摂取によって、体毛中水銀量の増加および尿中、糞中水銀の排泄促進作用が認められた。
3. D-システインの摂取時期の違いによって体内の水銀蓄積量に差がみられ、本実験条件下においてはD-システインは水銀と同時に摂取するより、水銀摂取後遅れて摂取する方が体内水銀蓄積抑制効果が大きいことが示唆された。

文 献

- 1) Kerper L. E., Ballatori N. and Clarkson T. W.: Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. *Am. J Physiol.* 262, R761-R765 (1992)
- 2) Aschner M.: Brain, kidney and liver ²⁰³Hg-methylmercury uptake in the rat: relationship to the neutral amino acid carrier. *Pharmacol. Toxicol.*, 65, 17-20 (1989)
- 3) Harada M.: Minamata disease; methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.*, 25, 1~24 (1995)
- 4) Elhassani S. B.: The many faces of methylmercury poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 19, 875-906 (1982)
- 5) Pichichero M. E.: Mercury concentrations and metabolism in infants receiving

- vaccines containing thiomersal. *Lancet*, 360, 1737 ~ 1741 (2002)
- 6) Ballatori N., Lieberman M. W. and Wang W.: N-acetylcysteine as an antidote in methylmercury poisoning. *Environ. Health Perspect.*, 106, 267-271 (1998)
- 7) Hirayama K.: Effects of combined administration of thiol compounds and methylmercury chloride on mercury distribution in rats. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 2030-2032 (1985)
- 8) Krijgsheld K. R., Glazenburg E. J., Scholtens E. and Mulder G. J.: The oxidation of L- and D-cysteine to inorganic sulfate and taurine in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 677, 7-12 (1981)
- 9) Adachi T., Yasutake A., Hirayama K.: Influence of dietary levels of protein and sulfur amino acids on the fate of methylmercury. *Toxicology*, 93, 225-234 (1994)
- 10) 日本薬学会：食品衛生試験法 注釈2000，p374～393，金原出版（2000）
- 11) 田村行弘, 真木俊夫, 嶋村保洋, 落合節子, 西垣進：生体試料中の総水銀・メチル水銀・セレンの分析法, 水銀とセレン（鈴木, 大井, 井村編）, p64～72, 篠原出版（1977）
- 12) 土屋健三郎：金属中毒, p218, 医歯薬出版（昭和58年）
- 13) Ishihara N.: Excretion of methylmercury in human feces. *Arch. Environ. Health*, 55, 44-47 (2000)